

1. Созданная тест-система может быть использована для количественного определения слияния BCR-ABL и транскриптов ДНК, содержащей (Ph⁺) транслокации t(9; 22) в главных критических точках кластера региона (M-BCR) b2a2 и b3a2, соответственно, в РНК или мРНК образцах, приготовленных из нативных или очищенных человеческих белых кровяных клеток, полученных из крови или костного мозга путем аспирации.

2. Тест-система предназначена для мониторинга успешности терапии и в научных исследованиях для оценки влияния факторов на течение ХМЛ.

Литература:

1. Functional characterization of the promoter region of the human EVI1 gene in acute myeloid leukemia: RUNX1 and ELK1 directly regulate its transcription / M. Maicas [et al.] // *Oncogene*. – 2012 Jun 11. doi: 10.1038/onc.2012.222.

2. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia –A Europe Against Cancer Program / J. Gabert [et al.] // *Leukemia*. – 2003. – Vol. 17. – P. 2318–2357.

3. Hughes, T. Molecular monitoring of BCR–ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia / T. Hughes, S. Branford // *Blood reviews*. – 2006. – Vol. 20. – P. 29–41.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ СУММАРНОЙ ОЦЕНКИ ТРАНСКРИПТОВ СУРВИВИНА

***Семенов В.М., Шляхтунов Е.А., Поляржин В.В.,
Субботина И.А., Пашинская Е.С., Егоров С.К.***

УО «Витебский государственный медицинский университет

Нарушение апоптоза, приводящее к накоплению клеток, содержащих поврежденную ДНК, дефекты митотического аппарата ведут к возникновению раковой опухоли и, в конечном счете, ее прогрессии [1]. В балансе между пролиферацией и программируемой смертью клетки основную роль играют белки семейства IAP (IAP - inhibitors of apoptosis) - белки-ингибиторы апоптоза [2]. Среди белков, ингибирующих апоптоз, ключевую роль играет сурвивин. Его экспрессию можно обнаружить в большинстве видов опухолей, в то время как в нормальных тканях она практически не детектируется. Члены семейства IAP обычно содержат несколько бакуловирусных IAP повторений (BIR) доменов. В связи с этим сурвивин, также называют бакуловирусным протеином, который у людей закодирован геном BIRC5. Экспрессия генов BIRC5 высока в период внутриутробного развития и в большинстве опухолей. Экспрессия гена сурвивина отрегулирована клеточным циклом и выражена в фазах G2-M.

В настоящее время установлено, что белок сурвивин участвует в контроле клеточного деления, регуляции апоптоза, ангиогенезе [3]. Его антиапоптотическая функция заключается в прямом или опосредованном ингибировании каспаз, за счет связывания сурвивина с белком SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase). SMAC - митохондриальный белок, который выходит из митохондрий в цитозоль во время апоптоза. SMAC, связываясь с белками семейства IAP, предотвращает их ингибирующее действие по отношению к каспазам, обеспечивая активацию каспаз и развитие апоптоза [4].

Сурвивин, селективно синтезируясь в наиболее распространенных опухолях человека, способствует резистентности опухолевых клеток к противоопухолевым агентам и ионизирующим излучениям [1, 2]. Выключение синтеза сурвивина с использованием антисенс-олигонуклеотидов, доминант-негативных мутаций, рибозимов и ингибиторов циклинзависимых киназ увеличивает уровень апоптоза, уменьшает потенциал роста опухоли, восстанавливая чувствительность опухолевых клеток к химиотерапии с разными механизмами действия и гамма-излучению в различных типах опухолей человека. В свою очередь, высокий уровень синтеза сурвивина в опухолях коррелирует с их прогрессией [1].

Существует несколько форм локализации белка сурвивина в клетке, эти формы локализации независимо регулируются, обладают различными посттрансляционными модификациями. Подробно изучены 2 формы локализации белка сурвивина - ядерная и цитоплазматическая, но их иммуногистохимическая характеристика не дает необходимой и достаточной информации для характеристики клеток, определяющей их онкологическое перерождение. Существует еще мало изученная митохондриальная форма локализации сурвивина. Механизм перемещения сурвивина в митохондрию пока не изучен, но предположительно, такое перемещение связано с участием шаперона Hsp90. Показано, что в опухолевых клетках наблюдается стократное увеличение аффинности этого шаперона к переносимым им белкам, в том числе и сурвивину [2]. Митохондриальный сурвивин под действием различных апоптотических стимулов быстро высвобождается из митохондрий и выходит в цитозоль [1]. Он подавляет активацию каспаз, усиливает образование опухолей *in vivo*, а также участвует в формировании кровеносных сосудов важных для доставки кислорода и питания опухолей. Такой процесс поддерживает гомеостаз, обеспечивая опухолевый рост при участии ростовых факторов, выделяемых как самой опухолью, так и прилегающей тканью.

С учетом того, что в настоящее время в клинической практике невозможно определить уровень белка сурвивина, большие надежды возлагают на использование молекулярно-биологических методов диагностики. Ген сурвивина кодируется 17q25 хромосомой человека, и состоит из 3 интронов и 4 экзонов [4]. Альтернативный сплайсинг сурвивина продуцирует 5 форм мРНК: сурвивин, сурвивин 2В, сурвивин 2А, сурвивин

3В и сурвивин deltaEx3, однако роль каждого из них в глиомагенезе и регуляции апоптоза клетки до конца не изучена.

Цель исследования. Создание тест-системы для суммарной оценки транскриптов сурвивина методом совмещенных реакций обратной транскрипции и ПЦР (ОТ-ПЦР) в различном клеточном и клиническом материале.

Материал и методы. Разработку праймеров и зондов для ОТ-ПЦР проводили с использованием *in silico* анализа. Информацию о первичной структуре генов сурвивин, сурвивин 2В, сурвивин 2А, сурвивин 3В и сурвивин deltaEx3 получали с использованием данных международных баз геномов <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.genome.tdb.org/annotation/genome/tdb/>, [Gene Index.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/Genbank.html). Оценку конформации образуемых олигонуклеотидов и силу связи, температуру плавления вторичных структур осуществляли с использованием онлайн-программы <http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Quickfold> и <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. Праймеры и зонды для ПЦР были подобраны с учетом структур экзонов и интронов. Оптимальную температуру отжига праймеров и зондов подбирали экспериментально с использованием режима «градиент температур». Уровень экспрессии форм мРНК сурвивина измеряли в относительных единицах, определяемых методом сравнения индикаторных циклов на основе математического анализа формы кривой амплификации (Cp) сурвивинатокина и HPRT1 по формуле, с учетом эффективности амплификации; значения индикаторного цикла в образце для HPRT1; значения индикаторного цикла в образце для сурвивина. Уровень экспрессии фактически отражал представленность транскрипта в сравнении с нормировочным геном.

Результаты и обсуждение. В результате работы впервые в Республике Беларусь была создана тест-система для определения количественной суммарной оценки транскриптов сурвивина (семейство ингибиторов апоптоза), включая все известные варианты сплайсинга в образцах РНК / мРНК.

Созданную тест-систему оценивали вместе с cDNA, в полученных из 76 замороженных первичных образцов опухоли 79 взрослых пациентов (саркомы мягких тканей) до начала лечения, согласно требованиям Директивы 98/79/ЕС Европейского парламента.

Основные параметры созданной тест-системы представлены в таблице.

Таблица. Характеристика тест-системы для обнаружения транскриптов сурвивина

Характеристики	Образец	Производительность
Аналитическая чувствительность	Синтетическая ДНК Сурвивина	≥5 копий за пробег
Линейный диапазон	Синтетическая ДНК Сурвивина	>5 логарифмов

Созданная тест-система прошла клинические испытания в РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова, РНПЦ детской

онкологии, гематологии и иммунологии и зарегистрирована в Республике Беларусь.

Выводы.

1. Разработанная тест-система для определения количественной суммарной оценки транскриптов сурвивина может быть использована в онкологии и клинической медицине.

2. Применение тест-системы позволит расширить понимание роли сурвивина в онкогенезе и клеточной реакции на внешние раздражители, роли этого белка в ангиогенезе и пролиферации опухоли, что, в конечном счете, создаст возможность использования разработанного метода для оценки эффективности химиотерапии.

Литература:

1. Dallaglio, K. Survivin: a dual player in healthy and diseased skin / K. Dallaglio, A. Marconi, C. Pincelli // J Invest Dermatol. - 2012. – 132 (1). - P. 18-27.

2. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics / A.C. Mita [et. al] // Clin Cancer Res. - 2008. – 14 (16). - P. 5000-5.

3. Novel survivin inhibitor YM155 elicits cytotoxicity in glioblastoma cell lines with normal or deficiency DNA-dependent protein kinase activity / P.C. Lai [et. al] // Pediatr Neonatol. - 2012. – 53 (3). - P. 199-204.

4. Survivin promotes glioma angiogenesis through vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in vitro and in vivo / P. Wang [et. al]. // Mol Carcinog. - 2012. – 51 (7). - P. 586-95.

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ HER2/NEU ТРАНСКРИПТОВ

***Семенов В.М., Шляхтунов Е.А., Побяржин В.В., Субботина И.А.,
Пашинская Е.С., Егоров С.К., Семенов С.В.***

УО «Витебский государственный медицинский университет»

В настоящее время установлено, что белок HER-2/neu - трансмембранная рецепторная тирозинкиназа, экспрессируется преимущественно в эпителиальных клетках и кодируется геном, локализованным в 17q хромосоме. Основной особенностью рецепторных тирозинкиназ является их трансмембранная локализация и необходимость во взаимодействии с соответствующим лигандом (активирующим фактором), для реализации киназной активности и последующих биологических эффектов.

Молекулярная масса рецептора HER-2/neu составляет 185 килодальтон (kDa), поэтому его также иногда называют белком p185. Молекула рецептора состоит из внутреннего тирозинкиназного домена, небольшой